КИНЕТИКА И КАТАЛИЗ, 2022, том 63, № 2, с. 212–222

УДК 577.152.+542.952+579.22

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ГЕТЕРОГЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СИНТЕЗА МОНОЭФИРОВ ДИОЛОВ

© 2022 г. Г. А. Коваленко[a], *, Л. В. Перминова[a], М. В. Шашков[a], А. Б. Беклемишев[a, b]

[a]ФГБУН ФИЦ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, просп. Акад. Лаврентьева, 5, Новосибирск, 630090 Россия

[b]НИИ биохимии ФИЦ ФТМ СО РАН, ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117 Россия

*e-mail: galina@catalysis.ru

Поступила в редакцию 02.07.2021 г.
После доработки 14.08.2021 г.
Принята к публикации 14.08.2021 г.

Проведены исследования процессов низкотемпературного синтеза сложных эфиров гептановой (энантовой, C7:0) кислоты и различных диолов с участием гетерогенных биокатализаторов, приготовленных путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы r*Pichia*/lip на макропористом углеродном аэрогеле. В качестве субстратов изучены диолы, различающиеся длиной углеродного скелета (от 2 до 6 атомов C), положением OH-группы и изомерией углеродного скелета, такие как 1,2-этандиол (этиленгликоль) и его олигомеры (ди- и три-), 1,2-пропандиол (пропиленгликоль), 1,3-пропандиол, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол, а также 2-этил-1,3-гександиол. Реакцию этерификации и синтеза моноэфиров гептановой кислоты проводили в реакторах периодического действия в очень мягких условиях (20 ± 2°C, 1 бар). Свойства приготовленных биокатализаторов, такие как ферментативная активность, субстратная специфичность и операционная стабильность, были исследованы в зависимости от строения молекулы диола и природы органического растворителя (хлороформ, гексан, ацетон). Обнаружено, что короткоцепочечные диолы C_2–C_4 необратимо ингибировали иммобилизованную липазу, и биокатализатор полностью инактивировался в течение 1–3 реакционных циклов. Максимальное значение активности, равное 83 ЕА/г, и конверсию кислоты, равную 94% за 24 ч, наблюдали в реакции этерификации гептановой кислоты 1,6-гександиолом, при этом в изученных условиях доля моноэфира составила более 99%. Была обнаружена корреляция между активностью приготовленных биокатализаторов и длиной молекулы симметричных диолов; так, скорость реакции этерификации повышалась при увеличении расстояния между концевыми OH-группами. Поскольку хлороформ инактивировал адсорбированную r*Pichia*/lip, то были подобраны условия реактивации биокатализаторов путем замены реакционной среды, а именно, растворителя на гексан и диола на бутанол.

Ключевые слова: биокаталитическая этерификация, рекомбинантная липаза, иммобилизация, синтез моноэфиров диолов

DOI: 10.31857/S0453881122020046

ВВЕДЕНИЕ

Сложные эфиры органических кислот и спиртов являются ценными продуктами органического синтеза и широко востребованы на рынке. Эти продукты находят применение в различных областях промышленности, включая парфюмерную (душистые вещества), косметическую (эмоллиенты), пищевую и фармацевтическую отрасли, а также производство моющих средств, лаков, красок и синтетических моторных топлив (поверхностно-активные вещества).

Эфиры жирных кислот и многоатомных спиртов (алифатических полиолов) обладают высокими чистящими, моющими, а также эмульгирующими, диспергирующими и стабилизирующими свойствами. Их используют в производстве пластмасс в качестве мономеров и пластификаторов. Кроме того, данные соединения являются одним из компонентов синтетических смазочных масел. Добавление к нефтяной основе технически обоснованного количества эфира с целью получения так называемого сложноэфирного масла приводит к существенному улучшению его эксплуатационных параметров, таких как повыше-

Сокращения и обозначения: ДОС – диоктил себацинат; МУА – макропористый углеродный аэрогель; ЕА – единица активности; ГХ-МС – газовая хроматомасс-спектрометрия; ТСХ – тонкослойная хроматография; а. ц. – активный центр.

ние смазочных и вязкостно-температурных характеристик, снижение температуры застывания [1]. Высокое качество сложноэфирных смазочных материалов служит основой для разработки базовых авиационных и редукторных масел, а также универсальных и всесезонных (в том числе, арктических) моторных масел.

Высококачественные полусинтетические масла отечественного производства были разработаны в 70–80 гг. XX в. [1, 2]. В маслах *1-го поколения* использовали сложные эфиры алифатических двухосновных кислот и одноатомных спиртов. Диэфирные масла имели высокий индекс вязкости (до 160) и были работоспособны в интервале температур от –60 до +175°C. Наиболее широкое применение нашел диизооктиловый эфир себациновой кислоты (диоктил себацинат, ДОС) [1]. Себациновая кислоты представляет собой двухосновную предельную карбоновую кислоту (декандиовая кислота, $HOOC–(CH_2)_8–COOH$). Масло, приготовленное на основе высокоочищенной нефтяной базовой жидкости и ДОС, работало при температуре –50 до +50°C. Полностью синтетическое масло с добавлением ДОС, предназначенное для форсированных транспортных дизелей специального назначения, позволяло осуществлять холодный запуск при –30°C. Диоктил себацинат как пластификатор является продуктом, востребованным полимерной промышленностью.

В маслах *2-го поколения*, разработанных для самолетов с газотурбинным двигателем, летающих с двукратным превышением скорости звука, в качестве основы применяют сложные эфиры многоатомных спиртов. В качестве таких спиртов используют полиолы неопентана (2,2-диметилпропан, $C(CH_3)_4$), триметилолэтан, триметилолпропан, пентаэритрит (2,2-*бис*(гидроксиметил) пропан-1,3-диол, $C(CH_2OH)_4$), а также их димеры (ди-триметилолпропан, ди-пентаэритрит). Масла 2-го поколения превосходят масла 1-го поколения по смазочным характеристикам, летучести, термостабильности и ряду других показателей [1, 2]. Например, масла 2-го поколения работоспособны в интервале температур от –60 до +200°C. Примером добавки в такие масла является продукт реакции этерификации пентаэритрита и монокарбоновых кислот (или их смесей) алифатического ряда, нормального строения, например, синтетических $C_5–C_9$ жирных кислот, получаемых окислением нефтяных парафинов. Наиболее ценные продукты – эфиры энантовой (C7:0) и пеларгоновой (C9:0) кислот. Важное практическое значение имеют также несимметричные сложные эфиры димерных многоатомных спиртов (ди-триметилолпропана, ди-пентаэритрита) и сравнительно доступных низкомолекулярных карбоновых кислот $C_5–C_6$.

Первая и единственная промышленная установка по производству сложных эфиров синтетических жирных кислот и пентаэритрита была построена и пущена в эксплуатацию в 1961 г. В Уфе по технологии, разработанной заводом им. Шаумяна. Процесс химической этерификации проводили при температуре 160–210°C. Воду, образовавшуюся в реакции, удаляли путем подачи азота при интенсивном перемешивании реакционной среды. В оптимальных условиях степень конверсии кислот достигала 98%. При использовании в качестве гомогенных катализаторов сильнокислотных или щелочных реагентов наблюдались как высокая коррозия оборудования, так и сложности с очисткой целевого продукта. Применяемый для повышения полноты этерификации избыток карбоновых кислот полностью терялся вместе со щелочными стоками. Процесс характеризовался достаточно низким выходом целевого продукта (~70%), в котором содержались спирты с непрореагировавшими OH-группами, что снижало термоокислительную стабильность продукта. При химическом синтезе всегда получалась смесь несимметричных эфиров неустановленного состава. Начиная с 2002 г. в России отсутствует производство сложных эфиров полиолов и практически остановлено производство химически чистых индивидуальных веществ: монопентаэритритолов, ди- и три-пентаэритритолов, а также низкомолекулярных синтетических жирных кислот $C_5–C_9$, без которых невозможен выпуск высококачественных смазочных материалов для современной техники [2].

Ферментативный “зеленый” синтез разнообразных сложных эфиров с участием липаз (гидролаза эфиров глицерина) (К.Ф. 3.1.1.3) в качестве активных компонентов катализаторов привлекают пристальное внимание специалистов в области органического синтеза благодаря уникальным свойствам этих ферментов, прежде всего, наличию хемо-, регио- и стереоспецифичности катализируемых химических реакций. На сегодняшний момент липазы и гетерогенные биокатализаторы на их основе являются многотоннажными промышленными продуктами; например, компания “NOVO” (novozymes.com) является лидером в производстве и продаже гомогенных и гетерогенных биокатализаторов, обладающих активностью липазы, в том числе, предназначенных для органического синтеза. Следует отметить, что в настоящее время получены кристаллические формы липаз бактериального происхождения, расшифрованы их аминокислотные последовательности, промоделированы третичные структуры их белковых молекул, что значительно ускоряет генноинженерные работы по конструированию рекомбинантных (мутантных) высокопродуктивных штаммов, продуцирующих липазы с заданными свойствами. Липазы обладают уникальной среди

ферментов способностью сохранять ферментативную активность в органических растворителях, практически не содержащих воды (известно, для работы практически всех ферментов необходима водная буферная среда). В научных обзорах [3–9] описаны различные липазы и их каталитические свойства, а также области их практического применения. Данные, представленные в [3–9], позволяют сделать вывод о том, что "зеленые" биокаталитические процессы, включая ферментативный синтез сложных эфиров, являются достойной альтернативой органическому синтезу, поскольку дают возможность проводить реакции при низких температурах (ниже 50°C) без образования побочных продуктов.

В настоящее время опубликовано небольшое число научных работ по исследованию "зеленого" синтеза эфиров многоатомных спиртов, в том числе, диолов. В работе [10] была изучена реакция синтеза эфиров лауриновой кислоты (C12:0) и симметричного 1,4-бутиленгликоля с участием панкреатической липазы. В оптимальных условиях, при соотношении реагентов кислота : диол = = 1 : 5, конверсия лауриновой кислоты составила 78% при 30°C за 24 ч [10]. При использовании липазы в трех реакционных циклах (кратность равна 2), конверсия кислоты уменьшилась с 78 до 27% [10], т.е. скорость реакции этерификации в третьем реакционном цикле упала почти в 3 раза. В работе [11] авторы исследовали реакцию этерификации пропионовой кислоты 2-этил-1,3-гександиолом, протекающую в гексане с участием биокатализатора Lipozyme® IM ("NOVO Nordisk Bioindustrials, Inc."), приготовленного путем иммобилизации липазы из *Mucor miehei* на макропористом полимере. Для удаления воды (продукта реакции) применяли ионообменную смолу марки Dowex, реакцию проводили в реакторе с движущимся слоем мелкодисперсного биокатализатора (a simulated moving bed reactor (SMBR)). Конверсия кислоты в изученных условиях составила 79–93%, выход моноэфира – 25–44% при температуре 22 ± 2°C [11].

Интересная реакция ферментативного синтеза полиэфиров описана в работе [12]. Реакцию переэтерификации и одновременной полимеризации между диэфирами C_4–C_{10} дикарбоновых кислот и алифатическими диолами C_4–C_8 проводили с участием биокатализатора Novozym® 435 ("NOVO"), приготовленного иммобилизацией липазы B из *Candida antarctica* на метакриловом полимере. В данной реакции были успешно синтезированы различные полиэфиры, например, из диэфиров с длиной внутренней углеродной цепи от 4 атомов углерода (C_4) (сукцинат) до C_{10} (себацинат) и диолов с длиной цепи от C_4 (1,4-бутандиол) до C_8 (1,8-октандиол). Синтезированные в работе [12] полиэфиры имели молекулярную массу от 6000 до 13000 Да, конверсия составила ≥90%. Так, в реакции между диметил адипинатом и 1,8-октандиолом при 85°C за 24 ч получили продукт с молекулярным весом 7141 Да [12].

В работе [13] была исследована реакция синтеза эфиров насыщенных жирных кислот (каприновой C10:0, лауриновой C12:0 и пальмитиновой C16:0) и полиэтиленгликоля ПЭГ-400, протекающая в смеси бензола с гексаном при участии панкреатической липазы. В оптимальных условиях при соотношении субстратов (кислота : ПЭГ = 1 : 1.8) образовывался сложный эфир, при этом значения конверсии каприновой, лауриновой и пальмитиновой кислот составили 80, 78 и 44% соответственно при 25°C за 48 ч [13].

Биокатализаторы, приготовленные путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы r*Pichia*/lip на макропористом углеродном аэрогеле (МУА), ранее были изучены в реакции этерификации насыщенных жирных кислот C_4–C_{18} алифатическими спиртами C_2–C_{16} [14–17]. Было показано, что скорость реакции этерификации гептановой (энантовой, C7:0) кислоты с участием иммобилизованной r*Pichia*/lip является максимальной независимо от природы первичного алифатического спирта C_3–C_{16} и состава органического растворителя или смесей растворителей [16, 17].

В настоящей работе проведены сравнительные исследования биокатализаторов, приготовленных путем адсорбции липазы r*Pichia*/lip на МУА, в процессах низкотемпературного синтеза эфиров гептановой кислоты C_7 с различными диолами, различающимися длиной (от 2 до 6 атомов C), изомерией углеродного скелета и положением OH-группы, такими как 1,2-этандиол (этиленгликоль) и его олигомеры (ди- и три-), 1,2-пропандиол (пропиленгликоль), симметричные диолы, содержащие концевые первичные OH-группы – 1,3-пропандиол, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол, а также разветвленный 2-этил-1,3-гександиол. Для проведения реакции этерификации использовали органические растворители (гексан, хлороформ, ацетон), выбор которых определялся, прежде всего, растворимостью субстратов и продуктов ферментативной реакции. Были проведены сравнительные исследования по влиянию структуры диолов на свойства приготовленных биокатализаторов, а именно, на их ферментативную этерифицирующую активность, субстратную специфичность и операционную стабильность, в периодическом процессе низкотемпературного синтеза моноэфиров гептановой кислоты и различных диолов.

Таблица 1. Свойства биокатализаторов, приготовленных адсорбцией r*Pichia*/lip на макропористом углеродном аэрогеле, в контрольной реакции синтеза бутил гептаноата

Растворитель	Начальная активность*, ЕА/г	Конверсия кислоты за 6 ч, %	Сохранившая активность после пяти реакционных циклов, %
Гексан	399.7 ± 28.0	93	90
Хлороформ	23.3 ± 2.3	40	<10
Ацетон	4.0 ± 0.3	7	20

* Условия реакции: 20 ± 2°C, 0.24 ± 0.02 М гептановая кислота, 0.48 ± 0.04 М *н*-бутанол.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гетерогенные биокатализаторы получали путем адсорбции рекомбинантной липазы *T. lanuginosus* (обознач. r*Pichia*/lip) на макропористом углеродном аэрогеле (МУА), описанном в работе [15]. Для этого навеску адсорбента МУА (1 вес. ч.) заливали буферным раствором (0.02 М фосфатный буфер, pH 7.0) липазы (100 об. ч.) с начальной концентрацией белка 2.9 мг/мл, и при периодическом перемешивании выдерживали в течение 1 сут при 20 ± 2°C. Затем раствор липазы декантировали, биокатализатор промывали буфером, удаляли излишки влаги фильтровальной бумагой и сушили до суховоздушного состояния в тонком стационарной слое в условиях окружающей среды (20 ± 2°C, 1 бар) в течение 1–2 сут. Величину адсорбции липазы (мг/г) рассчитывали, исходя из концентрации белка в растворе до и после адсорбции. Концентрацию белка в растворе измеряли при помощи красителя Кумасси G-250 методом [18], для построения градуировочного графика использовали бычий сывороточный альбумин (“SIGMA”). Величина адсорбции составила 100 ± 25 мг/г.

Реакцию этерификации проводили при 20 ± ± 2°C в реакторах смешения периодического действия, а именно, в герметично закрываемых сосудах (виалах) объемом 20 см^3. Высушенные биокатализаторы (0.01 г) заливали реакционной средой (3.0 мл), содержащей субстраты – кислоту и диол в хлороформе, и интенсивно перемешивали в течение реакции. Было найдено, что растворимость диолов в хлороформе была максимальной по сравнению с другими растворителями (гексаном, диэтиловым эфиром, ацетоном); содержание биокатализатора в данной реакционной среде, составило 2.2 мас. %. Биокатализаторы, потерявшие активность в хлороформе, реактивировали в среде гексана в реакции синтеза бутил гептаноата (контрольная реакция). Поскольку плотность гексана в 2 раза ниже, чем у хлороформа, то содержание биокатализатора в среде было равно 4.2 мас. %.

В реакции этерификации начальная концентрация гептановой C_7 кислоты составляла 0.25 ± ± 0.03 моль/л; бутанол и диолы вносили в двух- и трехкратном молярном избытке соответственно; в случае диолов на каждую –COOH приходилось шесть OH-групп. В качестве растворителей использовали гексан, хлороформ и ацетон (табл. 1). Начальную скорость реакции определяли по линейному участку кинетической кривой убыли гептановой кислоты, концентрацию которой анализировали методом титриметрии с помощью этанольного раствора NaOH с известной молярностью (0.0256 ± 0.0006 моль л$^{-1}$) с применением фенолфталеина как индикатора точки эквивалентности. Скорость реакции и активность биокатализаторов рассчитывали и выражали, соответственно, в мкмоль л$^{-1}$ с$^{-1}$ и в единицах активности (ЕА) на 1 г сухого биокатализатора (1 ЕА = = мкмоль мин$^{-1}$).

Ферментативную активность биокатализаторов (ЕА/г) измеряли в периодических реакционных циклах. В первом цикле биокатализаторы проходили стадию кондиционирования, при этом их активность увеличивалась в 2–4 раза. Это было обусловлено тем, что внутри биокатализатора аккумулировалась вода, образующаяся в ходе этерификации, при этом формировалось благоприятное водное микроокружение для липазы, адсорбированной на МУА. После окончания этерификации реакционную смесь, содержащую небольшое количество кислоты, спирт и сложный эфир, декантировали. Биокатализаторы многократно промывали растворителем (гексаном), затем выдерживали в растворителе в течение не менее 20 ч для десорбции субстратов и продукта реакции с поверхности МУА. Следующий реакционный цикл проводили с отмытым биокатализатором в среде, состав которой описан выше.

Исходные реагенты и продукты реакции анализировали методом газовой хроматомасс-спектрометрии (ГХ-МС). Для всех анализов была использована высокополярная колонка собственной разработки на основе ионной жидкости N-пропил-6-метил-хинолиний-бис(трифторметилсульфонил)имида (10 м × 0.25 мм × 0.2 мкм) [19]. Условия разделения для всех образцов следующие. Температурная программа термостата колонок включала выдержку при 100°C (3 мин), далее

программирование со скоростью 10°C/мин до конечной температуры 280°C. Температура испарителя составляла 280°C, скорость потока газа-носителя (гелия) – 1 мл/мин. Условия работы масс-спектрометра такие: электронная ионизация – 70 эВ, температура источника ионизации – 230°C, температура переходной линии – 250°C. Спектр регистрировали в режиме сканирования в диапазоне 40–450 *m/z*. Для качественного анализа использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ), аналогично описанному в работе [14].

Статистическую обработку результатов проводили по критерию Стьюдента с доверительной вероятностью 0.95, количество измерений n = 3–6. Относительная ошибка не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано ранее [14–17], скорость реакции ферментативной этерификации гептановой (энантовой, C7:0) кислоты является максимальной по величине независимо от длины углеродного скелета первичного алифатического спирта C_3–C_{16}, поэтому эта кислота была выбрана в качестве субстрата для исследований гетерогенных биокатализаторов, полученных адсорбцией r*Pichia*/lip на МУА.

При подборе органического растворителя для приготовления реакционной среды использовали следующие критерии: 1) субстрат ферментативной реакции – диол, и продукты – моно- и диэфиры, хорошо растворимы в реакционной среде; 2) не наблюдается существенная инактивация исследуемых биокатализаторов в течение реакционного цикла; 3) растворители не обладают высокой токсичностью, неогнеопасны и доступны. Выбор растворителя также определялся достижением практически важных целевых показателей, таких как: i) максимальная скорость реакции этерификации с участием диолов, или, соответственно, максимальная конверсия кислоты за минимальное время; ii) максимальный выход целевого продукта – МОНОэфира (без образования диэфира); iii) максимальная продуктивность биокатализатора, прежде всего, за счет его высокой операционной стабильности и многократного использования в реакционных циклах.

Ранее в работах [16, 20] для реакции синтеза эфиров этилен- и пропиленгликолей были выбраны и изучены следующие растворители: ацетон и смесь ацетона с гексаном в соотношении 3 : 1 (об. ч). Как показали исследования [16], ацетон инактивировал r*Pichia*/lip. Так, скорость реакции синтеза эфира гептановой кислоты и гексадеканового (цетилового, C_{16}) спирта уменьшалась почти на порядок, если ацетон использовали в качестве сорастворителя в гексане (1/4 : 1, об. ч) [16]. Из табл. 1 также видно, что скорость реакции синтеза бутил гептаноата в ацетоне на два порядка ниже по сравнению со скоростью этерификации в гексане. Кроме того, биокатализаторы, работающие в ацетонсодержащих средах, обладали сравнительно низкой операционной стабильностью и в течение шести реакционных циклов теряли до 80% первоначальной активности [16]. Таким образом, смеси гексана и ацетона были далеки от оптимальных с точки зрения влияния на ферментативную активность иммобилизованной липазы. В настоящей работе в качестве растворителя был выбран хлороформ, в котором все изученные диолы и синтезированные эфиры хорошо растворялись. Скорость реакции этерификации в хлороформе была в ~17 раз ниже по сравнению со скоростью этерификации в гексане (табл. 1). Хлороформ, аналогично ацетону, значительно инактивировал активный компонент биокатализатора, а именно, r*Pichia*/lip, что приводило к полной потере биокаталитической активности в течение 3–4 реакционных циклов (табл. 1). Однако, как показано ниже, инактивация липазы в хлороформе протекала обратимо, т.е. активность биокатализаторов частично или полностью восстанавливалась при замене хлороформа на гексан.

В настоящей работе были исследованы свойства приготовленных биокатализаторов в реакции синтеза эфиров гептановой кислоты и различных диолов (табл. 2). Максимальная начальная скорость реакции наблюдалась при этерификации с участием 1,6-гександиола; при выбранном молярном соотношении субстратов (кислота : диол = 1 : 3) доля моноэфира составила 99% при практически полной конверсии кислоты, равной 94% за 24 ч (табл. 2).

Скорость синтеза эфиров гептановой кислоты с короткоцепочечными диолами C_2–C_3, содержащими как первичные, так и вторичные ОН-группы, была чрезвычайно низкой (близкой к нулю); конверсия кислоты выше 50% регистрировалась через 7 сут. Проведенные анализы методами ГХ-МС и ТСХ показали, что в изученных условиях синтезировались преимущественно моноэфиры диолов (рис. 1). В случае 1,4-бутандиола реакция протекала в течение первых 2 ч, начальная активность была рассчитана из начального линейного участка кинетической кривой и составила 80.5 ЕА/г (табл. 2). Затем реакция останавливалась на конверсии кислоты 25%, и дальнейшего изменения в величине конверсии не наблюдалось в течение последующих 1–2 сут. Было также обнаружено, что диолы C_2–C_4 необратимо инактивировали липазу r*Pichia*/lip, поскольку биокатализаторы не восстанавливали этерифицирующую активность после реактивации в контрольной реакции синтеза бутил гептаноата в гексане. Так, после первого реакционного цикла синтеза эфиров гептановой кислоты и 1,4-бутандиола актив-

Таблица 2. Начальная активность биокатализаторов в реакции этерификации гептановой кислоты и различных диолов в хлороформе

Диол	Начальная активность биокатализатора, ЕА/г	Конверсия кислоты, % (за *x* ч)	Доля моноэфира, % (за *x* ч)
Симметричные, первичные ОН-группы			
1,2-Этандиол	<1	2 (24 ч) 18.5 (168 ч)	100.0 (24 ч) 99.3 (168 ч)
1,3-Пропандиол	<1	15 (24 ч) 71 (168 ч)	96.5 (24 ч) 90.2 (168 ч)
1,4-Бутандиол	80.5	25* (2 ч)	
1,6-Гександиол	83.7	94.4 (24 ч)	98.6 (24 ч)
Несимметричные, первичная и вторичная ОН-группы			
1,2-Пропандиол	<1	25 (24 ч) 69 (168 ч)	98.6 (168 ч)
2-Этил-гексан-1,3-диол	67.6	67.8 (6 ч)	97.9 (6 ч)
Этиленгликоли, первичные ОН-группы			
Этиленгликоль	<1	2 (24 ч) 18.5 (168 ч)	100.0 (24 ч) 99.3 (168 ч)
Ди-этиленгликоль	25.7	53.6 (7 ч)	98.3 (7 ч)
Три-этиленгликоль	58.0	84.1 (7 ч)	96.5 (7 ч)

* Реакция этерификации останавливается через 2 ч.

ность (A) биокатализатора во втором цикле составила лишь 0.5% от его первоначальной (A_0) активности, A = 1.1 ЕА/г от A_0 =210.1 ЕА/г. Короткоцепочечные диолы C_2-C_4 имеют 3 класс опасности, и, вероятно, способны инактивировать различные ферменты, в том числе, жизненно важные, такие как, липазы (wikipedia.org).

Более длинные диолы, 1,6-гександиол и разветвленный 2-этил-гексан-1,3-диол, этерифицировались с заметными скоростями (табл. 2). В изученных условиях при конверсии гептановой кислоты выше 70% доля моноэфиров 1,6-гександиола и 2-этил-гексан-1,3-диола составили 99 и 98% соответственно (табл. 2, рис. 2). Обнаруженные этиловые и бутиловые эфиры гептановой кислоты (рис. 2, пики *1*, *1a*) образовывались из примесей этанола и бутанола, присутствующих в реактивах. При этерификации 2-этилгексан-1,3-диола этерифицировалась только первичная ОН-группа (рис. 2б, пик *4*).

Как было показано ранее, вторичные и третичные ОН-группы спиртов практически не участвуют в этерификации, катализируемой r*Pichia*/lip; скорость реакции, соответственно, на два порядка ниже или равна нулю по сравнению с первичными ОН-группами [17]. На примере бутанола и его изомеров было продемонстрировано, что вторичные и третичные спирты не являются ни субстратами, ни ингибиторами r*Pichia*/lip, в отличии от соответствующих диолов C_2–C_4, которые, как отмечалось выше, необратимо ингибируют/инактивируют липазу. В настоящей работе подтверждено, что вторичная группа 2-этилгексан-1,3-диола практически не участвовала в реакции (рис. 2б, пик *4* и *4a*).

В представленной работе авторами было высказано предположением о том, что важную роль при этерификации гептановой кислоты играет размер молекулы диола, а именно, максимальное расстояние между первичными концевыми ОН-группами. Действительно, наблюдалась корреляция между активностью приготовленных биокатализаторов и данным расстоянием: чем оно больше, тем выше этерифицирующая активность приготовленных биокатализаторов (рис. 3). Для этиленгликоля и его олигомеров наблюдается практически линейная зависимость (рис. 3, кривая *1*), анализ которой позволил предложить следующий механизм синтеза сложных эфиров с участием липазы r*Pichia*/lip. Из обзорной литературы [7, 21–23] известно, что в активном центре (а.ц.) липазы находятся остатки трех аминокислот Ser–Glu–His (серин–глутаминовая кислота–гистидин), участвующих в катализе реакции гидролиза триглицеридов по кислотно-основному механизму. Липаза *T. lanuginosus* и аналогичная ей липаза r*Pichia*/lip относятся к типу RmL, для которых характерно следующее строение активного центра: а. ц. с каталитической триадой аминокислот расположен близко к поверхности ферментной глобулы; для субстрата-кислоты и его ацильной группы имеется узкая щель, для субстрата-спирта – широкая щель а. ц. [24]. С помощью

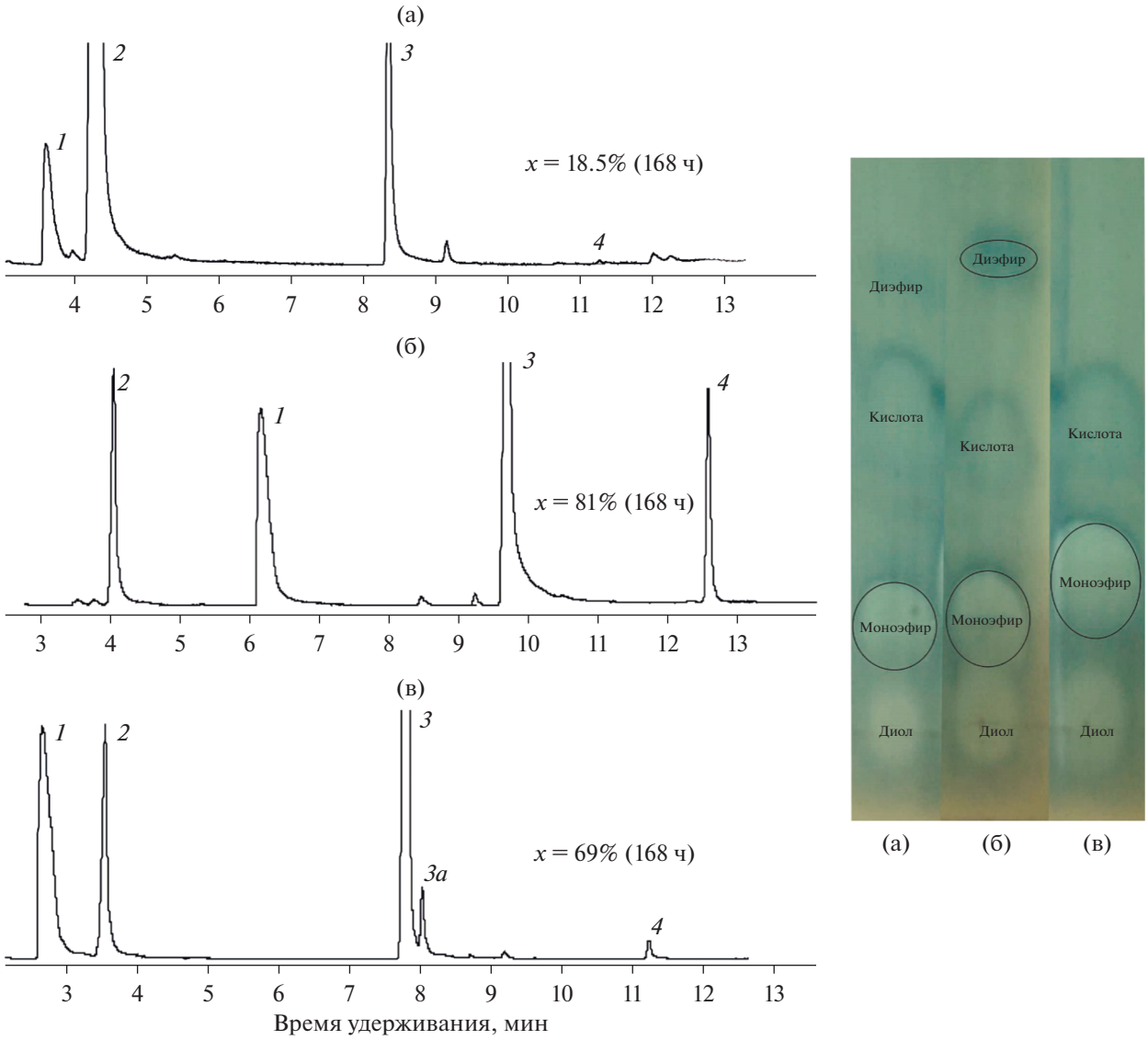

Рис. 1. ГХ-МС- и ТСХ-анализ реакционных смесей, в которых использовали 1,2-этандиол (а), 1,3-пропандиол (б), 1,2-пропандиол (в): *1* – исходный диол, *2* – гептановая кислота, *3*, *3a* – моноэфир, *4* – диэфир.

программы HyperChem® были рассчитаны максимальные расстояния (L_{max}, нм) между концевыми OH-группами в “вытянутой” молекуле диолов, а также максимальное расстояние между крайними протонами в молекуле гептановой кислоты. При этерификации первый субстрат (S_1), гептановая кислота (L_{max} = 1.0 нм), входит в активный центр липазы (E) и образует промежуточный фермент-субстратный комплекс ES_1, к которому подходит второй субстрат (S_2), в данной случае, диол. Если максимальная длина диола больше глубины залегания активного центра, то фермент-субстратный комплекс ES_1S_2 является продуктивным и “распадается” на E и продукты – сложный эфир и воду. Если диол короткоцепочечный, то его вторая OH-группа входит в а.ц.; в этом случае возможно взаимодействие этой группы с остатками аминокислот стенок щелей а.ц., глубина которого оценивается в 0.6–1.0 нм (область максимальной активности на рис. 3, кривая *2*). В результате, C_2–C_3-диолы либо деформируют а.ц., либо блокируют выход продуктов реакции, прежде всего, эфира. Длина молекул C_4–C_6-диолов сравнима с глубиной а.ц., катализ протекает эффективно, особенно с 1,6-гександиолом (рис. 3). Интересно, что для олигомеров этиленгликоля (ди- и три-) наблюдалась линейная зависимость от максимальной длины молекулы (рис. 3).

Была исследована стабильность приготовленных биокатализаторов в периодическом процессе синтеза моноэфиров различных диолов. Как отмечалось выше, при работе в хлороформе биока-

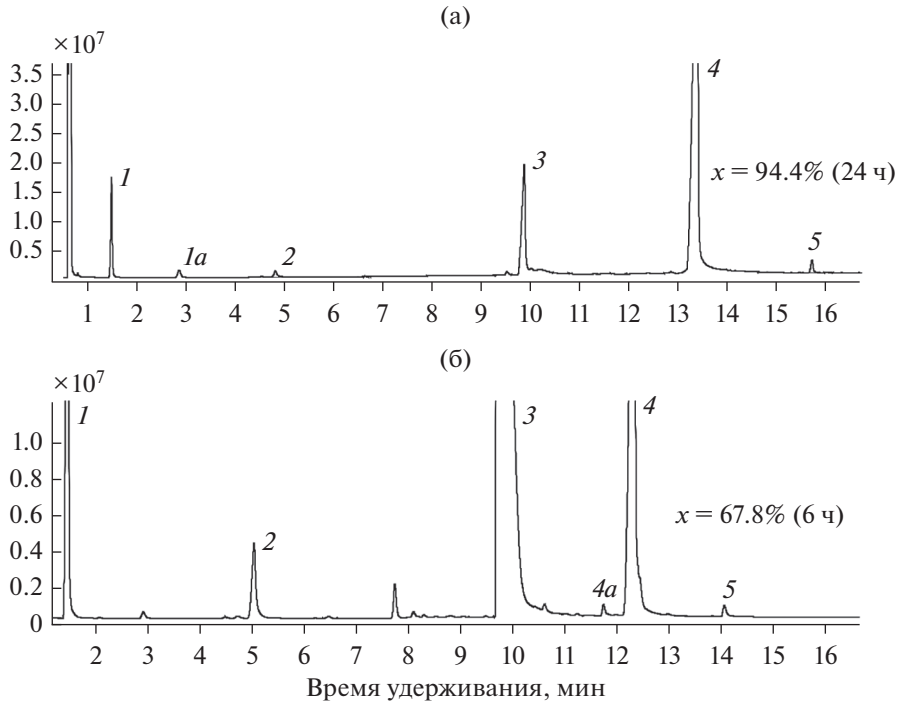

Рис. 2. ГХ-МС-анализ реакционных смесей, в которых использовали 1,6-гександиол (а) и 2-этилгексан-1,3-диол (б): *1*, *1a* – примесные эфиры (этил гептаноат, бутил гептаноат), *2* – гептановая кислота, *3* – исходный диол, *4*, *4*а – моноэфир, *5* – диэфир.

тализаторы полностью инактивировались за 1–3 реакционных цикла, поэтому мы изучили возможность их реактивации путем замены реакционной среды, а именно, растворителя хлороформа на гексан и диола на *н*-бутанол. Так, после каждого реакционного цикла синтеза моноэфира диола в хлороформе, следующий цикл проводили в гексане в реакции синтеза бутил гептаноата. Обнаружено, что при такой замене реакционной среды активность биокатализаторов частично или полностью восстанавливалась и даже увеличивалась (в 1.1–1.3 раза) по сравнению с первоначальной активностью (рис. 4б). В реакции с участием диэтиленгликоля после 2-х реакционных циклов в хлороформе, биокатализатор так и не восстановил активность, потеряв, как отмечалось выше, более 99% от ее первоначальной величины. При использовании в качестве субстрата триэтиленгликоля полученные биокатализаторы отличались сравнительно высокой операционной стабильностью как в реакции синтеза его моноэфиров, так и в синтезе бутил гептаноата (рис. 4б, серые колонки, пунктирная линия). При использовании 1,6-гесандиола биокатализатор частично реактивировался, и его активность медленно падала от цикла к циклу (рис. 4а, черные колонки), в то время как в реакции синтеза бутил гептаноата инактивация биокатализатора протекала быстрее (рис. 4а, серые колонки, пунктирная линия). В случае диола с разветвленным углеродным скелетом биокатализатор инактивировался медленнее по сравнению с линейным диолом (рис. 4а и 4в). Так, за 20 реакционных циклов он сохранил 40 и 80% первоначальной активности при синтезе мо-

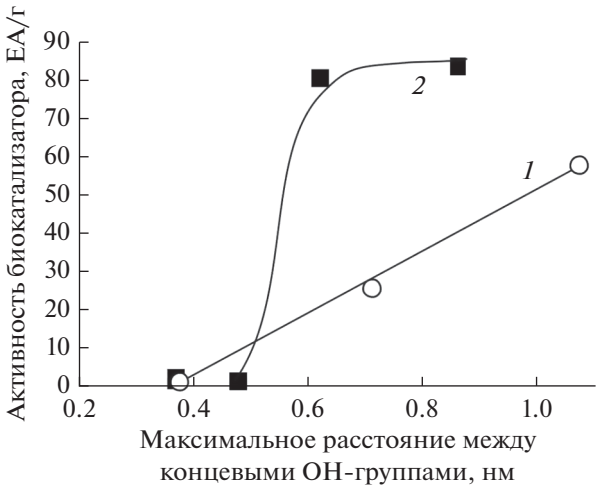

Рис. 3. Этерифицирующая начальная активность биокатализаторов в зависимости от максимального расстояния между концевыми OH-группами в молекуле симметричных диолов (*2*, ■) и этиленгликоля и его олигомеров (*1*, ○).

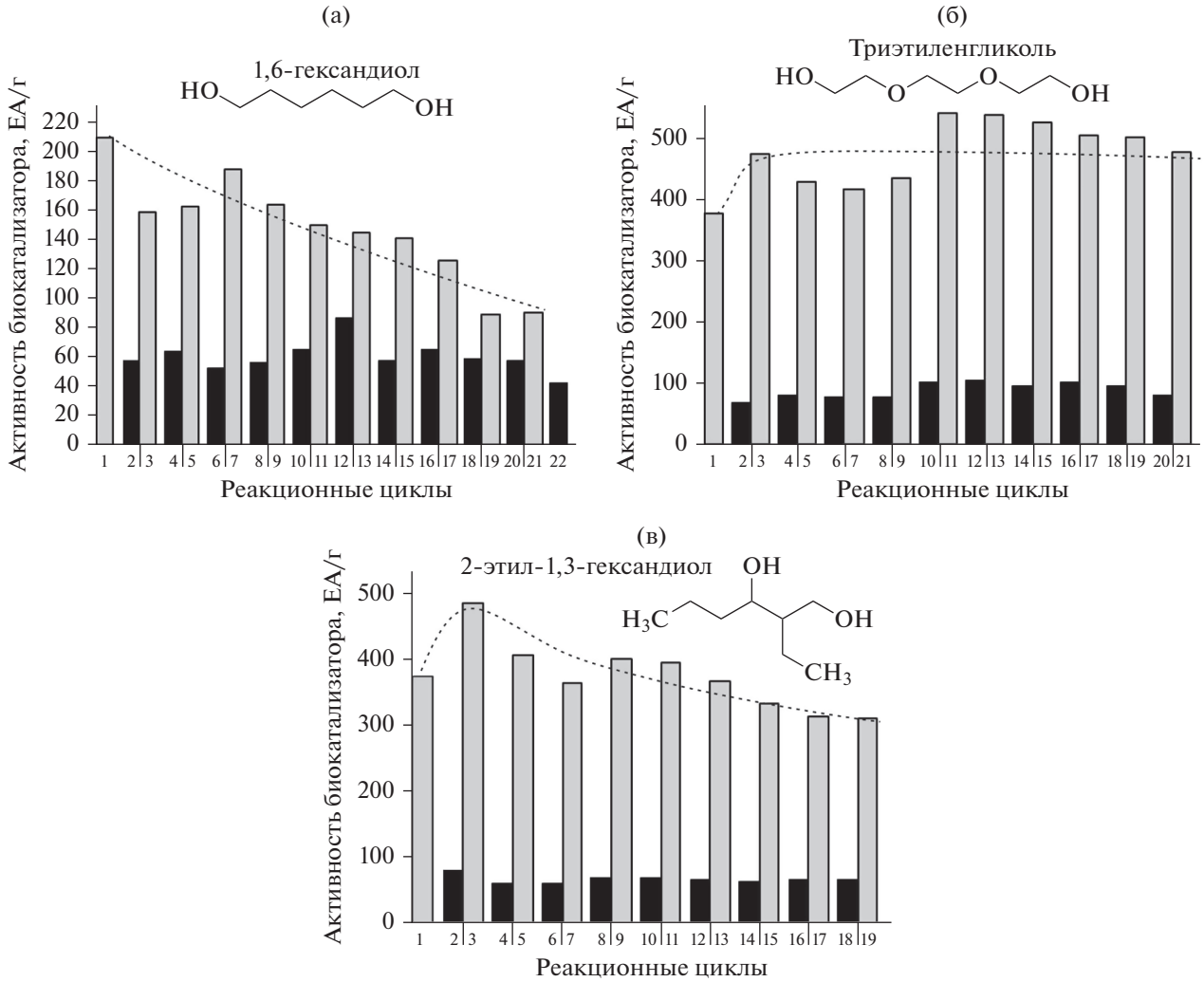

Рис. 4. Активность биокатализаторов в реакции этерификации гептановой кислоты 1,6-гександиолом (а), триэтиленгликолем (б) и 2-этил-1,3-гександиолом (в). Условия реакции: 20 ± 2°C, 0.1 г биокатализатора, 3.0 мл среды. Состав среды в четных реакционных циклах (черные колонки): 0.25 М кислота, 0.75 М диол, хлороформ. Состав среды в нечетных реакционных циклах (серые колонки): 0.25 М кислота, 0.5 М бутанол, гексан.

ноэфиров 1,6-гександиола и 2-этил-1,3-гександиола соответственно (рис. 4а и 4в). Таким образом, используя один и тот же биокатализатор, путем смены реакционной среды можно синтезировать различные эфиры, например, моноэфиры диолов и бутиловые эфиры гептановой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы процессы низкотемпературного синтеза сложных эфиров гептановой (энантовой, C7:0) кислоты и различных диолов с участием гетерогенных биокатализаторов, приготовленных путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы r*Pichia*/lip на макропористом углеродном аэрогеле. В качестве субстратов изучены диолы, различающиеся длиной углеродного скелета (от 2 до 6 атомов C), изомерией углеродного скелета и положением OH-группы. Реакцию этерификации проводили в реакторах периодического действия в хлороформе в очень мягких условиях (20 ± 2°C, 1 бар). Свойства приготовленных биокатализаторов, такие как ферментативная активность, субстратная специфичность и операционная стабильность, были изучены в зависимости от строения молекулы диола и природы органического растворителя (хлороформа, гексана, ацетона).

Было обнаружено, что короткоцепочечные диолы C_2–C_4 необратимо инактивировали/ингибировали иммобилизованную липазу r*Pichia*/lip, и биокатализатор полностью инактивировался в

течение 1–3 реакционных циклов. Максимальное значение активности, равное 83 ЕА/г, и практически полная конверсия кислоты были измерены в реакции этерификации гептановой кислоты и 1,6-гександиола, при молярном соотношении (кислота : диол = 1 : 3) доля синтезированного моноэфира составила 99%. Была обнаружена корреляция между увеличением активности приготовленных биокатализаторов и удлинением молекулы симметричных диолов с концевыми ОН-группами. Поскольку хлороформ инактивировал адсорбированную r*Pichia*/lip, то были подобраны условия реактивации биокатализаторов путем смены реакционной среды, и именно, замены хлороформа на гексан, а диола на бутанол. В этом случае биокатализаторы сохраняли этерифицирующую активность на высоком уровне в течение 20 реакционных циклов. Таким способом с помощью одного и того же биокатализатора, приготовленного адсорбцией рекомбинантной липазы r*Pichia*/lip на макропористом углеродной аэрогеле, были синтезированы различные эфиры гептановой кислоты, такие как бутиловые эфиры и моноэфиры диолов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по Проекту фундаментальных научных исследований в рамках государственного задания Института катализа СО РАН № 0239-2021-0005 “Катализаторы и процессы превращения возобновляемого сырья”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Л. Кузнецову за предоставленные образцы углеродного аэрогеля и М.Б. Пыхтиной за получение препарата липазы r*Pichia*/lip.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мамарасулова З.В., Громова В.В.* // Химическая промышленность. 2006. Т. 83. № 5. С. 251.
2. *Тонконогов Б.П., Попова К.А., Хурумова. А.Ф.* // Химическая технология топлива и высокоэнергетических веществ. 2015. Т. 278. № 1. С. 109.
3. *Jaeger K.-E., Egge T.* // Current Opinion in Biotechnology. 2002. V. 13. C. 390.
4. *Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2000. № 9. P. 113.
5. *Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R.* // J. Mol. Catal.B: Enzym. 2010. V. 64. P. 1.
6. *Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 66. P. 15.
7. *Fernandez-Lafuente R.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 62. P. 197.
8. *Contesini F.J., LopesD.B., Macedo G.A., Nascimento M., Carvalho P.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 67. P. 163.
9. *Безбородов А.М., Загустина Н.А.* // Прикл. Биохим. Микробиол. 2014. Т. 50. № 4. С. 347.
10. *Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С., Шнайдер К.Л., Назаренко Е.В.* // Вестник технологического Университета. 2015. Т. 18. № 1. С. 100.
11. *Meissner J.P., Carta G.* // Ind. Eng. Chem. Res. 2002. V. 41. № 19. P. 4722.
12. *Pellis A., Comerford J.W., Maneffa A.J., Sipponen M.H., Clark J.H., Farmer T.J.* // Eur. Polymer J. 2018. V. 106. P. 79.
13. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Калачева Н.В., Шнайдер К.Л.* // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. № 2. С. 73. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-2-73-78
14. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Патрушев Ю.В.* // Катализ в промышленности. 2017. Т. 17. № 5. С. 399. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2017-5-399-406
15. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Krasnikov D.V., Kuznetsov V.L.* // J. Porous Mater. 2018. V. 25. P. 1017. https://doi.org/10.1007/s10934-017-0512-0
16. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В.* // Катализ в промышленности. 2020. Т. 20. № 4. С. 313. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2020-4-313-322
17. *Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Чуканов Н.В., Патрушев Ю.В.* // Изв. АН. Серия химическая. 2017. № 11. С. 2194.
18. *Bearden J.C., Jr.* // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 533. P. 525.
19. *Shashkov M.V., Sidelnikov V.N., Bratchikova A.A.* // *Anal. Lett*. 2020. V. 53(1). P. 84.
20. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B.* // Catal. Today. 2021. V. 379. P. 36. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018
21. *Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R.* //J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 66. P. 15. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008
22. *Albayati S.H., Masomian M., Ishak S.N.H., Ali M.S.M., Thean A.L., Shariff F.M., Noor N.D.M., Rahman R.N.Z.R.A.* // Catalysts. 2020. V. 10. P. 747. https://doi.org/10.3390/catal10070747
23. *Contesini F.J., Davanço M.G., Borin G.P., Vanegas K.G., Cirino J.P.G., Melo R., Mortensen H., Hilden K., Campos D.R., Carvalho P.* // Catalysts. 2020. V. 10. P. 1032. https://doi.org/10.3390/catal10091032
24. *Naik S., Basu A., Soikia R., Madan D., Paul P., Chaterjii R., Brask J., Svenden A.* // J. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 65. P. 18.

Biocatalytic Heterogeneous Processes of Low-Temperature Synthesis of Diol Monoesters

G. A. Kovalenko[1, *], L. V. Perminova[1], M. V. Shashkov[1], and A. B. Beklemishev[1, 2]

[1]*Boreskov Institute of Catalysis of SB RAS, Federal Research, Akad. Lavrentiev Av. 5, Novosibirsk, 630090 Russia*

[2]*Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center FTM of SB RAS, st. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia*

**e-mail: galina@catalysis.ru*

The processes of low-temperature synthesis of esters of heptanoic (enanthic, C7: 0) acid and various diols using heterogeneous biocatalysts prepared by adsorptive immobilization of the recombinant lipase r*Pichia*/lip on macroporous carbon aerogel were investigated. Diols varied in the length of the carbon skeleton (from 2 to 6 C atoms), the position of the OH group, and the isomerism of the carbon skeleton. As substrates, 1,2-ethanediol (ethylene glycol) and its oligomers (di- and tri-), 1,2-propanediol (propylene glycol), 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol, and 2-ethyl-1,3-hexanediol were studied. The esterification and synthesis of monoesters of heptanoic acid was carried out in batch reactors in chloroform under very mild conditions (20 ± 2°C, 1 bar). The properties of the prepared biocatalysts, such as enzymatic activity, substrate specificity, and operational stability, were investigated depending on the structure of the diol molecule and the nature of the organic solvent (chloroform, hexane, acetone). It was found that short-chain diols C2–C4 irreversibly inactivated/inhibited immobilized lipase, and the biocatalyst was completely inactivated within 1–3 reaction cycles. The maximum activity, equal to 83 U/g, and the acid conversion, equal to 94% in 24 h, were observed in the esterification of heptanoic acid with 1,6-hexanediol, while the proportion of monoester was more than 99% under the studied conditions. A correlation was found between the biocatalytic activity and the molecular length of symmetric diols; thus, the rate of the esterification reaction increased with an increase in the distance between the terminal OH groups. Since chloroform inactivated the adsorbed r*Pichia*/lip, the conditions for the reactivation of the biocatalysts were selected by replacing the reaction medium, namely, the solvent with hexane and the diol with butanol.

Keywords: biocatalytic esterification, recombinant lipase, immobilization, synthesis of diol monoesters